

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 09234069 A

(43) Date of publication of application: 09 . 09 . 97

(51) Int. Cl

C12N 15/09
A61K 9/127
A61K 35/76
C07H 21/04
C07K 14/005
C12N 7/00
// A61K 48/00

(21) Application number: 08045252

(22) Date of filing: 01 . 03 . 96

(71) Applicant: DEINABETSUKU
KENKYUSHO:KK KANEDA
YASUSHI YONEMITSU
YOSHIKAZU

(72) Inventor: KANEDA YASUSHI
YONEMITSU YOSHIKAZU
HASEGAWA MAMORU

**(54) COMPOSITION FOR GENE TRANSDUCTION AND
GENE TRANSDUCTION USING THE SAME**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject composition capable of encapsulating DNA in high probability, high in rate of transducing nucleic acid into cells, thus useful for e.g. gene therapy, comprising virion (or virus-derived protein), cationic lipid and a nucleic acid.

SOLUTION: This composition for gene transduction

comprises (A) virion or virus-derived protein (pref. envelope protein or virion bearing the protein), (B) cationic lipid, and (C) a nucleic acid, i.e., a cyclic or straight-chain single- or double-stranded DNA or RNA or a chimeric form thereof, chemically modified by e.g. esterification, thiophosphorylation. This composition has low tendency to develop precipitate through forming a complex with in vivo component(s) or component(s) in a medium, therefore can be directly administered in vivo or incorporated into a medium.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-234069

(43)公開日 平成9年(1997)9月9日

(51)Int.Cl.⁶
C 12 N 15/09
A 61 K 9/127
35/76
C 07 H 21/04
C 07 K 14/005

識別記号 庁内整理番号
9282-4B

F I
C 12 N 15/00
A 61 K 9/127
35/76
C 07 H 21/04
C 07 K 14/005

技術表示箇所

A
L

B

審査請求 未請求 請求項の数 8 OL (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-45252

(22)出願日 平成8年(1996)3月1日

(71)出願人 595155107
株式会社ディナベック研究所
茨城県つくば市観音台1丁目25番11号
(71)出願人 596017923
金田 安史
大阪府箕面市小野原東6-12-8
(71)出願人 596029111
米満 吉和
福岡県福岡市博多区吉塚5-7-33
(72)発明者 金田 安史
大阪府箕面市小野原東6-12-8
(74)代理人 弁理士 清水 初志

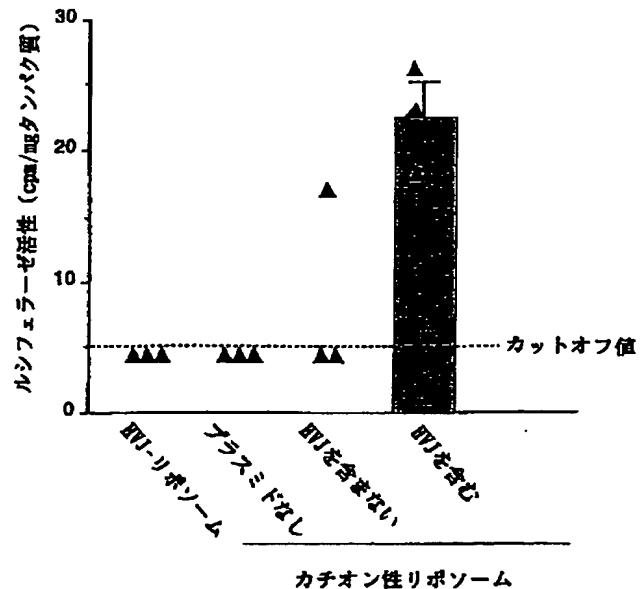
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子導入用組成物及び該組成物を用いた遺伝子導入方法

(57)【要約】

【課題】 本発明は、効率よく遺伝子を細胞内に導入するための組成物を提供することを課題とする。

【解決手段】 ウィルス粒子またはウィルス由来のタンパク質、カチオン性脂質及び核酸を含む遺伝子導入用組成物が提供された。該組成物を用いることによって、DNAの高い確率で封入すると同時に、封入されたDNAを細胞に高い効率で導入することができ、遺伝子を高頻度で細胞内に導入することができるようになった。本発明による遺伝子導入は、特に遺伝子治療分野における利用が期待される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ウィルス粒子またはウィルス由来のタンパク質、カチオン性脂質及び核酸を含む遺伝子導入用組成物。

【請求項2】 ウィルス粒子がエンベロープを有するものである、請求項1記載の組成物。

【請求項3】 カチオン性脂質がコレステロール骨格を有するものである、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】 カチオン性脂質が[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール(DC-Chol)である、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】 カチオン性脂質がグルタミン酸骨格を有するものである、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項6】 カチオン性脂質が塩化N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタミン酸(TMAG)である、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】 カチオン性脂質が4級アンモニウム塩である、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項8】 請求項1～7のいずれかに記載の組成物を用いることを特徴とする、核酸またはその誘導体を細胞内に導入する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、遺伝子工学分野、例えば遺伝子治療の分野に関する。

【0002】

【従来の技術】 薬物治療において、薬物(特に高分子化合物)を目的とする細胞又は細胞内組織に到達させるシステム、すなわちドラッグデリバリーシステム(Drug Delivery System; 以下単にDDSと言う)は重要な技術である。遺伝子治療においても、DDSを利用して遺伝子を所望の細胞に導入することが中心的な技術であることは言うまでもない。細胞内に遺伝子を導入するための方法は大きく二つに分類することができる。

【0003】 一つは、ウィルスベクターを用いる方法である。これには、所望の外來性遺伝子をゲノム上有するウィルスを感染させることにより、内部の核酸を細胞内に導入するという方法が含まれる。

【0004】 もう一つは、人工的なまたは半人工的な輸送担体(キャリアー)に、所望の遺伝子または該遺伝子を含むベクターを封入または担持させる方法である。この方法は、目的物の生体内挙動および輸送に関与する諸過程を、キャリアー自体の物理化学的性質に依存することにより、生理活性物質を所望の臓器(標的臓器)、細胞(標的細胞)または細胞内器官(標的器官)に到達せしめることを特徴とする。この方法におけるキャリアーとしては例えば、タンパク質(Human Gene Therapy, 5, 429, 1994)、ペプチド(Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America, 90, 893, 1993)、合成高分子化合物(The Journal of Biologic

al Chemistry, 269, 12918, 1994)、リポソーム(Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America, 92, 1774, 1995)およびセンダイウイルス(Exp. Cell Res., 159, 399, 1985)などを例示することができる。

【0005】 キャリアとしてリポソームを用いる方法には、様々な工夫が施されてきた。その一つにカチオン性脂質を利用する方法がある。この方法では、通常、リポソーム、カチオン性脂質及び核酸の混合物が利用されている(Felgner, P. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987))。

【0006】 更に、センダイウイルス(HVJ)は生体に対する毒性が少なく細胞親和性が高いので、キャリアとして大いに有用である。センダイウイルスをキャリアとして用いる際は、通常、不活性化したセンダイウイルス粒子、リポソーム及び核酸を混合した組成物(膜融合リポソーム)が利用されている(金田安史: BIOTHERAPY, 8, 1265(1994))。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 前記カチオン性脂質とDNAとの複合体は、DNAの封入効率は高いものの、エンドサイトーシス過程を経て細胞内に取り込まれる。そのため、かなりの比率の脂質/DNA複合体が、細胞内のエンドソーム等で分解されてしまう。また、それを回避するために多量の脂質/DNA複合体を投与した場合には、カチオン性脂質の細胞障害性が顕著に現れるため、実際に使用できる濃度が限られていた。更に、カチオン性脂質は、生体内および培地中の成分と複合体を形成して沈殿を生じるため、生体内に投与する場合および培地中で使用する場合は、遺伝子導入効率が著しく低下してしまった。そこで、細胞質内へ効率良く遺伝子を導入できるシステムの開発が必要とされていた。

【0008】 一方、センダイウイルスが細胞に融合する性質を利用した、前述のHVJ-膜融合リポソームを利用することで、細胞質内へ効率良く遺伝子を導入することが可能であるが、従来のHVJ-膜融合リポソームはDNAの封入効率が低いため、大量に投与した場合には、宿主細胞同士が細胞融合を起こす可能性が高く、実用に際して問題があった。(なお、封入効率が低いのは、HVJ-膜融合リポソームを作製する際に用いるリポソーム(アニオン性脂質)とDNAとの静電的反発等によって、リポソーム内に効率良くDNAを封入できないことに原因がある。) そこで、DNAを高い確率で封入すると同時に高い導入効率を達成する遺伝子導入用組成物が希求されていた。

【0009】 本発明は、効率よく遺伝子を細胞内に導入するための組成物を提供することを課題とする。また、本発明は、該組成物を用いた遺伝子導入方法を提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究した結果、ウイルス粒子またはウイルス粒子由来のタンパク質、カチオン性脂質及び核酸を含む組成物またはその溶解物を細胞に適用すると、該核酸が細胞に導入される割合が顕著に上昇することを見いだし、本発明を完成した。即ち、本発明は、以下のものを含む。

(1) ウイルス粒子またはウイルス由来の細胞親和性を有するタンパク質、カチオン性脂質及び核酸を含む遺伝子導入用組成物。

(2) ウイルス粒子がエンベロープを有するものである、(1)記載の組成物。

(3) カチオン性脂質がコレステロール骨格を有するものである、(1)または(2)に記載の組成物。

(4) カチオン性脂質が[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール(DC-Chol)である、(3)に記載の組成物。

(5) カチオン性脂質がグルタミン酸骨格を有するものである、(1)または(2)に記載の組成物。

(6) カチオン性脂質が塩化N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタミン酸(TMAG)である、(5)に記載の組成物。

(7) カチオン性脂質が4級アンモニウム塩である、(1)または(2)に記載の組成物。

(8) (1)～(7)のいずれかに記載の組成物を用いることを特徴とする、核酸またはその誘導体を細胞内に導入する方法。

【0011】なお、本発明において、ウイルス粒子とは、増殖能を有するウイルス粒子、ウイルス膜タンパク質と脂質により再構成された粒子の他、紫外線照射等によって不活化し、増殖能を失ったウイルス粒子も含まれる。ウイルス粒子の不活化は、紫外線照射、放射線照射等の物理的方法、酵素および抗ウイルス剤による処理等の化学的方法、遺伝子組換え技術を用いた分子生物学的方法等で行うことができる。

【0012】更に、本発明において、核酸とは、環状および直鎖状の1本鎖または2本鎖の、DNAおよびRNAもしくはそのキメラ体を意味し、エステル化、チオリン酸化等の方法によって化学的に修飾された核酸を意味する。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明に用いられるウイルス粒子としては、エンベロープタンパク質を有するものが好適である。たとえば、パラミクソウイルス科、オルソミクソウイルス科、ラブドウイルス科、レトロウイルス科、ヘルペスウイルス科、フィロウイルス科、トガウイルス科、フラビウイルス科、コロナウイルス科、ブンヤウイルス科、アレナウイルス科、ヘパドナウイルス科、ポックスウイルス科、バキュロウイルス科、イリドウイルス科の各種ウイルスのものが好適に用いられる。また、本発明に用いられるウイルス由来のタンパク質としては、エンベロープタンパク質、エンベロープ裏打ちタンパク

質、カプシドタンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質等が用いられる。具体的には、パラミクソウイルス科の各種ウイルスのHNタンパク質、Fタンパク質、オルソミクソウイルス科の各種ウイルスのHAタンパク質、NAタンパク質、ラブドウイルス科の各種ウイルスのGタンパク質、レトロウイルス科の各種ウイルスのエンベロープタンパク質、ヘルペスウイルス科の各種ウイルスのエンベロープタンパク質、フィロウイルス科の各種ウイルスのエンベロープタンパク質、トガウイルス科の各種

10 ウイルスのエンベロープタンパク質およびペロマー、フラビウイルス科の各種ウイルスのエンベロープ(E)タンパク質およびペロマー、コロナウイルス科の各種ウイルスのE1タンパク質およびE2タンパク質、ブンヤウイルス科の各種ウイルスのG1タンパク質およびG2タンパク質、アレナウイルス科の各種ウイルスのエンベロープタンパク質、ヘパドナウイルス科の各種ウイルスのエンベロープタンパク質、ポックスウイルス科の各種ウイルスのエンベロープタンパク質、バキュロウイルス科の各種ウイルスのエンベロープタンパク質、イリドウイルス科の各種ウイルスのエンベロープタンパク質等を含むことが好ましい。

【0014】本発明に用いられるカチオン性脂質は、核酸と複合体を形成するものであれば特に制限はないが、コレステロール骨格を有するもの、グルタミン酸骨格を有するもの、4級アンモニウム塩等が用いられる。コレステロール骨格を有するカチオン性脂質の例として[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール(DC-Chol)等、グルタミン酸骨格を有するカチオン性脂質の例として塩化N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタミン酸(TMAG)等、4級アンモニウム塩の例としてDOTMA(N-(1-(2, 3-ジオレイロキシ)プロピル)-N, N, N-トリメチルアンモニウムプロマイド)、DDAB(ジメチルジオクタクレシルアンモニウムプロマイド)、DOSPA(2, 3-ジオレイロキシ-N-[2(スペルミンカルボキシアミド)エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート)、DOGS(ジオレオイル-D-グルタメート-N-2(スペルミンカルボキシアミド)エチル)、DMRIE(1, 2-ジミリスチロキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムプロマイド)等が挙げられる。

【0015】また、本発明において、遺伝子が導入される細胞としては、インビトロ培養細胞、生体から抽出した細胞、生体内に存在する細胞等が挙げられる。遺伝子を細胞に導入するには、組織に直接注入する、静脈および標的組織の支配動脈等の血管内に投与する、エアロゾル化して呼吸器に投与する、生分解性カプセル等に封入して組織に埋め込む、消化管内で分解可能なカプセル等に封入して経口投与する等の方法が用いられる。インビ

40 50

トロ培養細胞への遺伝子導入には、溶液、凍結乾燥物、エアロゾルの形態の組成物が用いられる。

【0016】なお、本発明の組成物は、通常のカチオン性脂質と異なり、生体内および培地中の成分と複合体を形成して沈殿を生じにくいため、生体内に直接投与したり培地に混入して使用することが可能である。

【0017】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】再構成センダイウイルス粒子の調製
100個の発育鶏卵（9～10日目）を検卵し、希ヨードチンキ液で消毒した後、ポリペプトン溶液（1%ポリペプトン、0.2%NaCl、pH7.2）で希釀したセンダイウイルスシードを26ゲージの注射針を装着した1mlのディスポーバブルのシリンジで0.1mlずつ漿尿膜腔に投与した。十分な湿度を保ちながら35.5℃で4日間放置し、4℃で6時間以上放置した後、18ゲージの注射針を装着した10mlのディスポーバブルのシリンジにてそれぞれの鶏卵から漿尿液を回収した。回収した漿尿液800mlを、1000g、4℃で10分間遠心して上清を回収した。さらにこの上清を、27000g、4℃で30分間遠心しウイルスをペレットとして得た。10mlのBSS（137mMNaCl、5.4mMKCl、10mMTris-HCl、pH7.6）を加え、4℃で一夜放置した後、ペレットを懸濁し、2本のチューブに集め27000g、4℃で30分間遠心しペレットを回収した。2本のチューブに8mlのBSSを加え、4℃で3時間放置した後懸濁し、1000g、4℃で10分間遠心して得られた上清を精製したセンダイウイルスとして回収した。ニワトリ赤血球凝集活性が200万HAUの精製したセンダイウイルスを含む8mlのBSS溶液に0.5%NP-40を1mlを加え、4℃で30分間処理した後、10500g、4℃で75分間遠心し、上清を5mMのリン酸緩衝液（pH6.0）に対して4℃で3日間透析した。10500g、4℃で75分間遠心し、上清をリン酸緩衝液（pH6.0）で平衡したCM-セファロース（CM-Sepharose）にアプライし、ボイドボリューム（void volume）を回収した。F、HN蛋白の精製はSDS-PAGE後のCBB染色で確認した。2mgの凍結乾燥した脂質【ホスファチジルコリン：コレステロール8:1（重量比）】とボイドボリューム画分の1ml（約2mg蛋白含有）を混合し、0.85%NP-40を4mlを加えてボルテックスミックスし、0.3Mの蔗糖、1mMのKClを含む10mMのリン酸緩衝液（pH7.2）に対して4℃で6日間透析した後、ゲルろ過し540nmの吸収のピークの画分を回収した。この画分のニワトリ赤血球凝集活性を調べたところ2万HAUであった。この画分は、再構成センダイウイルスであり、この再構成センダイウイルスを用いて膜融合リポソームの調製が可能である。

【実施例2】カチオン性脂質によるDNAの封入

ホスファチジルコリン（PC）、コレステロール（CH0）、及びカチオン性脂質である[N-（N',N'-ジメチルアミノエタン）-カルバモイル]コレステロール（DC-chol）を重量比48:24:6で混合し、この混合物9.75mgに対し160μgのpEBC（InVitrigene社）を加え、BSS0.5mlにおいて、通常のボルテックス法でリポソームを作成後、CaCl₂及びDNaseIをそれぞれ1mM、100μg/mlになるように添加した。次いで、これをBSSに対して透析後、フェノール／クロロホルム-イソアミルアルコールで抽出し、さらにエタノール沈殿を行って、その沈殿物であるリポソームに封入されていたDNAに対しアガロース電気泳動を行った。その後、泳動したDNAを臭化エチジウム（EtBr）で染色し、デンシトメーターで定量を行った。なお、本実験のコントロールとして、従来法で使用されていたホスファチジルコリン、コレステロール、及びホスファチジルセリン（PS）の重量比48:20:10からなる混合物を等量用いた。

【0018】この結果、コントロールでは、DNAの封入率が10～15%にとどまったのに対し、カチオン性脂質を用いた場合は、50～60%となり、DNAの封入効率が4～6倍に上昇した。

【実施例3】カチオン性脂質を含むリポソームのセンダイウイルス（HVJ）への融合
実施例2で調製したPC、CHO、及びDC-cholの混合物9.75mgから作成したリポソームを不活性化したセンダイウイルス溶液0.5mlと融合させ、その後蔗糖密度勾配遠心を行い、融合していないリポソーム及びセンダイウイルスの分離を行った。なお、本実験のコントロールとして、実施例1で用いたコントロールと同じ組成の混合物を等量用いて同様の実験を行った。

【0019】この結果、コントロールでは、未反応のセンダイウイルスが認められたが、DC-cholを含むリポソームを用いた場合はほとんど認められなかった。すなわち、カチオン性脂質を含むことによりリポソームのセンダイウイルスに対する融合能が上昇した。

【実施例4】カチオン性脂質を含むHVJ-膜融合リポソームを用いたインビトロ（in vitro）での遺伝子導入
重量比48:20:10のPC、CHO及びDC-cholからなる混合物を9.75mg調製し、該混合物に9kbpのルシフェラーゼ遺伝子を発現させるプラスミドであるpcLucを200μg、HMG1タンパク質を65μg、ボルテックス法により混合させリポソームを作成した。次いで、これらの混合物を不活性化したセンダイウイルスと融合させた後、直径60mmの細胞培養ディッシュあたり1～5×10⁵の293細胞及びBHK細胞にDMEM/FCS10%で遺伝子導入を行った。ルミノフォトメーターで、PicaGene試薬（和光純薬）を用いて48時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。本実験のコントロールとして、重量比48:20:10のPC、CHO、及びPSからなる混合物を等量用いて同様の実験を行った。

【0020】この結果、293細胞では、カチオン性脂質

であるDC-cholを含むリポソームを用いた場合、コントロールと比較して約10倍のルシフェラーゼ活性が検出された。一方、BHK細胞を用いた場合には、コントロール*

*と比較して約2倍のルシフェラーゼ活性が検出された。

【0021】

【表1】

脂質組成	光量 (Light Units/Dish)	
	293細胞	BHK細胞
PC:CHO:PS=48:20:10	11.8	2.4
PC:CHO:DC-chol=48:20:10	116.3	4.6

遺伝子導入効率をさらに高めるため、本実験における膜融合リポソームとセンダイウイルスとの融合前に、膜融合リポソームをアセチルセルロースフィルターに通す過程を加えるとともに、PC、CHO、及びDC-cholの重量比の調整を行い、BHK細胞にて同様の実験を行った。

【0022】この結果、0.45 μ mのアセチルセルロースフィルターに通す過程を加えた場合には、該過程がない実験の場合と比較して、約4倍のルシフェラーゼ活性が検出された。該過程に加え、さらに、PC、CHO、及びDC-※

※cholの重量比を48:24:6に改変したところ、ルシフェラーゼ活性はさらに約5倍に高まった。PC、CHO、及びDC-cholの重量比を48:24:6に調整し、アセチルセルロースフィルターを0.22 μ mにしたところ、アセチルセルロースフィルターが0.45 μ mの場合と比較して、さらに約1.5倍となつた。

【0023】

【表2】

脂質組成	フィルター	光量 (Light Units/Dish)	
		BHK細胞	
PC:CHO:DC-Chol=48:20:10	なし	4.6	
PC:CHO:DC-Chol=48:20:10	0.45 μ m	17.6	
PC:CHO:DC-Chol=48:24:6	0.45 μ m	84.1	
PC:CHO:DC-Chol=48:24:6	0.22 μ m	128.1	

【実施例5】カチオン性脂質を含むHVJ-膜融合リポソームを用いたインビボ(invivo)での遺伝子導入重量比48:20:10のホスファチディルコリン、コレステロール、及び[N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)ジドデシル-D-グルタミン酸(TMAG)]からなる混合物10mgに、pGL2-Control Vector (Promega社) 200ugを加え、ボルテックス法によりリポソームを調製した。このリポソームを不活化センダイウイルスとOD比で1:5で融合し、「HVJ-TMAG-リポソーム」を作成した。次いで、1mlのHVJ-TMAG-リポソームをコンプレッサー付きネブライザーでラットに噴霧し、ラットの気管内のルシフェラーゼ活性を測定した。比較対象として、TMAGに代えてホスファチディルセリンを用いた以外は「HVJ-TMAG-リポソーム」と同様の「HVJ-PS-リポソーム」及びセンダイウイルスを含まないこと以外は「HVJ-TMAG-リポソーム」と同様の「TMAG-リポソーム」を

用いた。また、コントロールとして、プラスミドを含まないHVJ-TMAG-リポソームを用いた。

【0024】この結果、「TMAG-リポソーム」を用いた場合には低いルシフェラーゼ活性が検出されたが、「HVJ-PS-リポソーム」を用いた場合には、コントロールと同様に、ルシフェラーゼ活性は検出されなかつた。一方、「HVJ-TMAG-リポソーム」を用いた場合には高いルシフェラーゼ活性が検出された(図1)。

【0025】一方、この実験においてラットの右肺下葉のルシフェラーゼ活性を測定したところ「HVJ-TMAG-リポソーム」を用いた場合にのみ高いルシフェラーゼ活性が検出された。その他の場合には、ルシフェラーゼ活性は検出されなかつた(図2)。

【実施例6】カチオン性脂質を含むHVJ-膜融合リポソームを用いたインビボ(invivo)での遺伝子導入重量比48:24:6のPC、CHO、及びDC-Cholからなる混合物

9

を9.75mg調製し、該混合物に単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-tk) を含むプラスミドを200ug、HMG1タンパク質を65ug、ボルテックス法により混合させリポソームを作成した。次いで、これらの混合物を不活化したセンダイウイルス0.5mlと融合させて「HVJ-DC-Chol-リポソーム」を調製した。比較対象としては、重量比48:20:10のPC、CHO、及びPSからなる「HVJ-PS-リポソーム」及びHSV-tkを含むレトロウイルスベクターを生産する細胞Φを用いた。C3H/NeNマウス脳内に 5×10^6 の悪性グリオーマ細胞 (RSV-M) を播種した後、2日目にプラスミド100ug相当のHVJ-DC-Chol-リポソーム、HVJ-PS-リポソーム及びΦをそれぞれ5匹の腫瘍内に投与した。Φについては、それ以外に3日目と4日目にも同様の投与を行った群も設定した。その後4日目より、ガンシクロビル10mg/kgの1日1回腹腔内投与を1週間継続した。遺伝子導入効果については、生存数と平均体重により評価を行った (図3、図4)。その結果、レトロウイルス生産細胞であるΦを投与した場合は効果が見られなかった。また、HVJ-DC-Chol-リポソームは、HVJ-PS-リポソームと同等以上の効果が認められた。

【0026】

【発明の効果】本発明によって、DNAの高い確率で封入すると同時に、封入されたDNAを細胞に高い効率で導入

* することができる遺伝子導入用組成物が提供され、遺伝子を高頻度で細胞内に導入することが可能となった。また、本発明の組成物は、通常のカチオン性脂質と異なり、生体内および培地中の成分と複合体を形成して沈殿を生じにくいため、生体内に直接投与したり培地に混入して使用することが可能である。本発明による遺伝子導入は、特に遺伝子治療分野における利用が期待される。

【図面の簡単な説明】

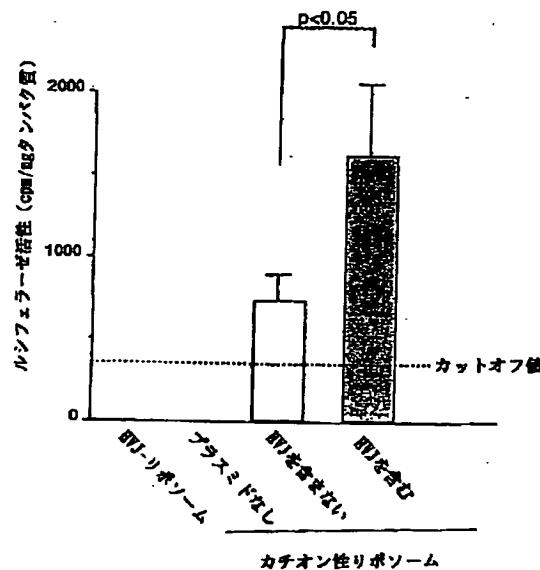
【図1】本発明のカチオン性脂質を含むHVJ-膜融合リポソーム及びその比較対象をラットに導入した際のラット気管内におけるルシフェラーゼ活性の測定結果を示す図である。

【図2】本発明のカチオン性脂質を含むHVJ-膜融合リポソーム及びその比較対象をラットに導入した際のラット右肺下葉におけるルシフェラーゼ活性の測定結果を示す図である。

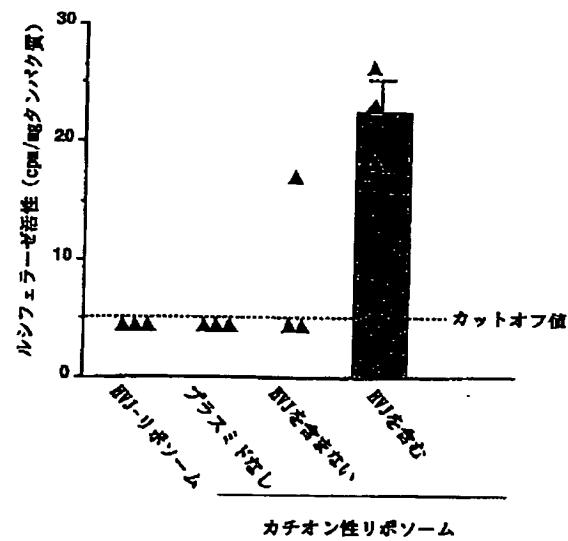
【図3】本発明のカチオン性脂質を含むHVJ-膜融合リポソーム及びその比較対象をマウス脳内に導入した際のマウスの生存数の経時的な測定結果を示す図である。

【図4】本発明のカチオン性脂質を含むHVJ-膜融合リポソーム及びその比較対象をマウス脳内に導入した際のマウスの平均体重の経時的な測定結果を示す図である。

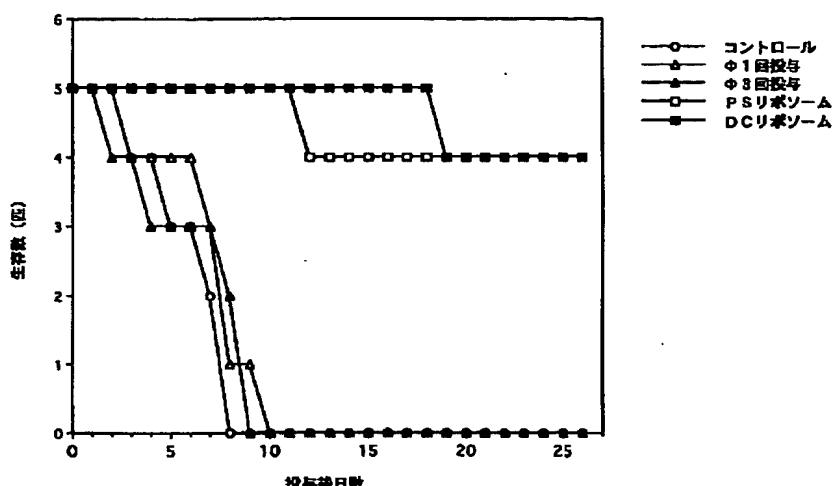
【図1】



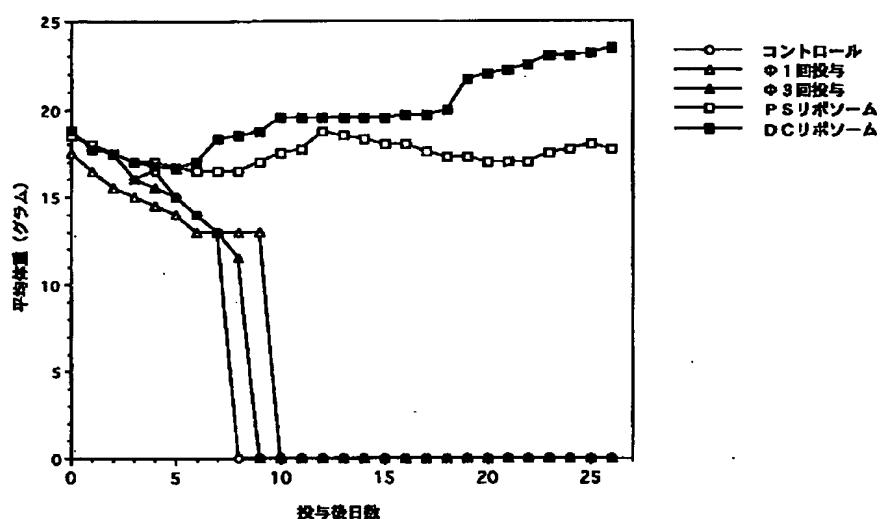
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C 12 N 7/00
// A 61 K 48/00

識別記号 庁内整理番号

F I

C 12 N 7/00
A 61 K 48/00

技術表示箇所

(72) 発明者 米満 吉和

福岡県福岡市博多区吉塚5-7-33

(72) 発明者 長谷川 譲

茨城県つくば市観音台1丁目25番11号ディ
ナベック研究所内